



扁桃体依存性不安行動におけるATP感受性カリウムチャネルの役割に関する研究

著者	稲垣 良
号	53
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	薬博第64号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00123971

論文内容要旨

【背景】 我が国における社会経済状況の変化に伴い、精神疾患を有する患者数は近年大幅に増加している。この現状を踏まえ、2011年に厚生労働省は地域医療の基本方針となる医療計画においてこれまで重点を置いてきた疾病である悪性腫瘍、脳卒中、急性心筋梗塞、糖尿病の四大疾病に、新たに精神疾患を加えて五大疾病とした。精神疾患は、精神や行動における特定の症状を呈することにより、日常生活を過ごす上での機能に支障をきたすことを特徴とし、その発症年齢は幼若期から老年期まで多岐に渡っている。しかしながら、いずれの精神疾患に対しても決定的な治療薬が存在しないのが現状であり、有用な治療薬の創出が期待されている。

不安障害は不安を主症状とする疾患全般の総称であり、生涯有病率は9.2%であると推定されている。その内訳としては恐怖症の有病率が最も多く、次いで全般性不安障害、PTSDとなっている。さらに、疫学的研究では、不安障害発症の誘因として慢性的なストレスが挙げられており、ストレス応答の制御に関わるコルチゾールをはじめ主要糖質コルチコイドによる生体内のホメオスタシス維持の破綻がその大きな要因とされている。近年の研究により、不安・恐怖は情動回路を形成している海馬・扁桃体における脳内神経伝達物質系が関与する脳機能異常であるという説が支持されているが、どのような遺伝子がこれら情動回路の動作機序の制御に関わっているのかは不明である。

コルチコステロンは副腎皮質から分泌される糖質コルチコイドの一種であり、視床下部-下垂体-副腎系を介した免疫反応、エネルギー代謝などの体内活動の制御に関与するホルモンである。ストレス負荷時にはコルチコステロンの分泌が亢進し、ストレス応答の制御に関わることから生体の神経内分泌制御機構に重要な役割を果たしている。また、コルチコステロンはグルココルチコイド受容体に結合することで知られており、コルチコステロンの慢性的な投与は海馬での樹状突起の減少そして神経新生を阻害することが確認されている。一方、扁桃体では海馬とは異なり、樹状突起の分枝および樹状突起棘の過剰な成長などの構造的変化が報告されている。これらの背景から、齧歯類への慢性的なコルチコステロン投与はヒトにおける不安障害やうつ病、外傷後ストレス障害の病理組織学的特徴および症状を呈するモデル動物の作製法として広く用いられている。以上のことから、我々はまず、慢性的コルチコステロン投与マウスを用いて行動薬理学的、電気生理学および生化学的手法を用いた解析を行い、これら情動回路の動作機序の制御に関与する遺伝子を見出

すことを目的とし、解析を行った。

ATP 感受性カリウム (K_{ATP}) チャンネルはカリウムイオンチャンネルファミリーの一種であり、内向き整流性カリウムチャンネル (Kir6.1 or Kir6.2) のサブユニットとスルホニルウレア (SUR) 受容体 (SUR1, SUR2A, or SUR2B) のサブユニットが四量体ずつ結合して形成されるヘテロ八量体複合体である。 K_{ATP} チャンネルは心臓、肺、平滑筋、脳をはじめとする様々な組織で局在が認められている。齧歯類の脳においては、 K_{ATP} チャンネルは Kir6.1/Kir6.2 と SUR 受容体から成り、Kir6.1 及び Kir6.2 がニューロンにおける豊富な発現が確認されている一方で、Kir6.1 はアストロサイトなどのグリア細胞においてもその発現が確認されている。遺伝子欠損マウスを用いた表現型解析においては、Kir6.2 遺伝子ホモ欠損 (Kir6.2^{-/-}) マウスは空間記憶の障害が確認された一方で、Kir6.1 遺伝子ヘテロ欠損 (Kir6.1^{+/-}) マウスは海馬歯状回での神経新生障害ならびにうつ様症状が報告されている。当研究室でも、Kir6.2^{+/-}ならびに Kir6.2^{-/-}マウスの認知機能障害及び海馬における LTP の減弱を報告している。従って、 K_{ATP} チャンネルは多様な精神疾患の発症に深く関与していることが考えられる。そこで、我々は次に K_{ATP} チャンネルを標的遺伝子とし、その遺伝子を欠損させたマウスを用いて不安様行動に関連した表現型の検討を行った。

【結果・考察】 本研究では、慢性的なコルチコステロン投与マウス (5 mg/kg, 14 days) における行動学および生化学的手法を用いた解析を起点としている。慢性的なコルチコステロン投与マウスは不安様行動・扁桃体依存的な恐怖記憶の亢進を示すとともに、音刺激による恐怖条件付け後の基底外側扁桃体において神経活動のマーカーである c-Fos 陽性細胞の顕著な増加を認めた。また、免疫ブロット法を用いた基底外側扁桃体での細胞内 Ca^{2+} シグナル伝達経路を検討した結果、慢性的なコルチコステロン投与は神経活動の亢進に関わる遺伝子である Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) α の自己リン酸化を増強させることが確認された。また、CaMKII α の自己リン酸化の増加に伴い、それに付随する長期増強 (LTP) が顕著に増大した。加えて、摘出した扁桃体の遺伝子解析により ATP 感受性 K^+ チャンネルサブユニット Kir6.1 の顕著な発現低下を見出した。そこで不安様行動の原因遺伝子としての Kir6.1 の役割を検討するために Kir6.1^{+/-}マウスを用いた表現型の解析を行った。Kir6.1^{+/-}マウスは慢性的なコルチコステロン投与マウス同様に不安様行動・扁桃体依存的な恐怖記憶の亢進を示すとともに、野生型マウスに比べて基底外側扁桃体における LTP の顕著な増大を認めた。次いで、音刺激による恐怖条件付け後の基底外側扁桃体に

おける細胞内 Ca^{2+} シグナル伝達経路を検討した結果、 $\text{CaMKII}\alpha$ と Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) の活性の顕著な増大を確認した。さらに、音刺激による恐怖条件付け後の $\text{Kir6.1}^{+/-}$ マウスの基底外側扁桃体における $\text{CaMKII}\alpha$ と ERK のリン酸化増大は下流シグナル因子である GluA1 ならびに CREB の過剰な活性化を促し、CREB の過剰活性は神経栄養因子である Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の発現量の顕著な増大を誘導した。一方、海馬 CA1 領域においても同様の解析を行ったが、野生型マウスとの間に大きな違いが確認されなかった。これらの結果より、 $\text{Kir6.1}^{+/-}$ マウスは慢性的なコルチコステロン投与マウス同様に扁桃体依存的恐怖記憶形成を増強し、恐怖条件づけ試験に伴う音刺激の際の基底外側扁桃体における $\text{CaMKII}\alpha$ の自己リン酸化の増大は CREB-BDNF 経路を活性化し、それに付随する LTP を増強させた。

本研究において、慢性的なコルチコステロン投与マウス及び $\text{Kir6.1}^{+/-}$ マウスは共に皮質-扁桃体投射神経経路の LTP の増大を示した。皮質-扁桃体投射神経経路の LTP にはシナプス後肥厚における NMDA 受容体と L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した後シナプス性の Ca^{2+} 動員が不可欠である。このことから、高頻度刺激が曝露された際の Kir6.1 発現量低下による細胞膜電位の閾値の低下による L 型電位依存性 Ca^{2+} チャネルを介した Ca^{2+} 流入促進は $\text{CaMKII}\alpha$ をはじめとしたカルシウムイオン依存性シグナル伝達に関わるプロテインキナーゼの活性変化に影響を与え、LTP の増大に寄与したことが示唆される。

加えて、基底外側扁桃体における Kir6.1 の発現低下がもたらす神経可塑性の増強には BDNF が関与していることが考えられる。BDNF の発現は $\text{CaMKII}\alpha$ と ERK の下流因子である CREB のリン酸化により制御されており、扁桃体における BDNF の発現はシナプス強度や神経の可塑的な変化に不可欠である。扁桃体における BDNF はその発現量によって音刺激による恐怖条件づけ記憶を制御することが知られている。また、それを示唆する知見として、BDNF 遺伝子過剰発現マウスにおいて不安様行動が増大する一方で、BDNF 遺伝子欠損マウスでは皮質-扁桃体投射神経経路の LTP 誘発が阻害され、恐怖記憶獲得が障害されるという報告がある。よって、 Kir6.1 の発現量が低下した基底外側扁桃体における音刺激後の BDNF 発現量の顕著な増大は、神経可塑性ならびに恐怖記憶増強の一因であることが示唆される。

【総括】 これらの結果より、本研究では不安様行動亢進の代表的なモデルマウスである慢性的なコルチコステロン投与モデルマウスにおける扁桃体に依存した記憶形成の増強に

は、基底外側扁桃体における **CaMKII α** の自己リン酸化及び **LTP** の亢進が寄与すること、さらに慢性的な **CORT** 投与モデルマウスで確認された基底外側扁桃体におけるカルシウムイオン依存性シグナル伝達系の亢進の要因として **Kir6.1** の発現量低下が関与していることを明らかとした。本研究結果が、不安障害をはじめ中枢神経疾患に適応する新たな治療薬創出につながれば幸甚の至りである。

論文審査結果の要旨

論文提出者：稲垣 良

論文審査委員（主査）：平澤 典保

論文題目：扁桃体依存性不安行動における ATP 感受性カリウムチャネルの役割に関する研究

不安障害は不安を主症状とする疾患の総称であり、生涯有病率が9.2%であると厚生労働省により報告されている。その内訳としては恐怖症の有病率が最も多く、次いで全般性不安障害、外傷後ストレス障害（PTSD）となっている。さらに、疫学的研究では不安障害の誘因として慢性的なストレスが挙げられており、ストレス応答に関わるコルチゾールをはじめ主要糖質コルチコイドによる生体内のホメオスタシス維持の破綻がその大きな要因とされている。本研究では不安様行動モデルマウスである慢性的コルチコステロン投与（CORT）マウスを作製して、行動薬理的、電気生理学および生化学的手法を用いて、情動回路の異常について解析した。次に、ATP 感受性カリウムチャネル（Kir6.1）ヘテロ欠損マウスにおける扁桃体依存性恐怖記憶形成の異常とそのメカニズムについて解析した。本研究ではつぎの知見を明らかにした。1) 慢性的な CORT 投与マウスでは音刺激による恐怖条件付け記憶の増強が観察され、それに伴って基底外側扁桃体のシナプス伝達長期増強の亢進が起こる。2) このシナプス伝達長期増強には Ca^{2+} /カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II（CaMKII）活性上昇と cAMP 応答配列結合タンパク質（CREB）リン酸化反応の亢進、続いて神経栄養因子（BDNF）の発現上昇が関与する。3) 慢性的な CORT 投与マウスの基底外側扁桃体において、Kir6.1 の蛋白質・mRNA 発現量は対照マウスに比べて顕著に低下する。4) Kir6.1 ヘテロ欠損マウスでは野生型マウスに比較して、音刺激による恐怖条件づけ記憶が増強され、基底外側扁桃体におけるシナプス伝達長期増強も増強される。5) 慢性的な CORT 投与マウスと同様に、基底外側扁桃体において、音刺激による CaMKII シグナルの活性を亢進することを示した。

以上、本研究では不安様行動亢進の代表的なモデルである慢性 CORT 投与マウスと Kir6.1 ヘテロ欠損マウスを用いて、扁桃体に依存した恐怖記憶形成の増強に、基底外側扁桃体における CaMKII の活性化とシナプス伝達長期増強の亢進が関与することを明らかにした。本研究結果により、不安障害に対する新しい創薬も期待できることから大いに評価できる。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として合格と認める。